



Universität für Bodenkultur Wien



**University of Natural Resources
and Life Sciences, Vienna**



WeinObstKlosterneuburg.at
Unser Wissen trägt Früchte.

BACHELORARBEIT

**Bestimmung von Alkohol und flüchtiger Säure in Weinen
mithilfe des Destillationsgerätes „Super Dee“ der Firma
Gibertini**

VerfasserIn
Mathias Regner
Julian Zeilinger

Angestrebter akademischer Grad:
Bachelor of Science

Bachelorstudium: Agrarwissenschaften, Weinbau, Önologie und Weinwirtschaft
BetreuerIn: DI Christian Philipp

Wien, 06. 06. 2017

Ein elektronisches Destillationsgerät namens SUPER DEE (Digital distilling unit mod. Super Dee) der italienischen Firma Gibertini soll getestet werden. Der Zeitaufwand einer Alkohol- und flüchtigen Säurebestimmung kann mithilfe dieser neuen Analyseapparatur, verglichen zu den akkreditierten OIV-Norm Analysemethoden, drastisch minimiert werden. Zusätzlich steht die hydrostatische Waage SUPER ALCOMAT von Gibertini zur Verfügung, mit welcher der vorhandene Alkohol (Vol.-%) bestimmt werden kann. Mithilfe einer Validierung der Gibertini Apparatur und einem Vergleich der Methoden soll Aufschluss über die etwaigen Abweichungen der Werte der neuen Weinanalyseapparatur gegenüber der akkreditierten OIV-Normen gegeben werden. Bei der Alkoholbestimmung konnte das Gerät die Limits der OIV, bezogen auf die Vergleichbarkeit, einhalten. Im Hinblick auf die Bestimmung der flüchtigen Säure konnte die Gibertini Apparatur durchgängig bessere Werte als die Referenzmethode mit der Woidich Apparatur erzielen. Auch hier wurden die Limits der OIV, bezogen auf die Vergleichbarkeit, eingehalten werden. Im Methodenvergleich konnte die Gleichwertigkeit der Apparatur über den gesamten Messbereich, sowohl für die Alkoholbestimmung als auch für die Bestimmung der flüchtigen Säure gezeigt werden. Die Bestätigung für die Verwendbarkeit lieferten die Bland-Altman-Diagramme, wo die „Limits of Agreement“ nur minimal über den Kriterien der Prüfstelle lagen. Insgesamt konnte die Leistungsfähigkeit der Gibertini Apparatur attestiert werden.

Schlagwörter: Alkoholbestimmung, flüchtige Säure Bestimmung, Methodvalidierung, Methodenvergleich, Bland-Altman, Gibertini, SUPER DEE, Destillation

The SUPER DEE (Digital distilling unit mod. Super Dee) device developed from the Italian Company Gibertini is being tested. With the new SUPER DEE device the time requirement for an alcohol and volatile acidity analysis can be drastically reduced compared to the accredit OIV-norm analysis method by distillation. Additionally there is also a hydrostatic scale named SUPER ALCOMAT from the Gibertini company in use for the analysis of available alcohol (Vol.-%). To detect some possible analysis deviances between the Gibertini device and the OIV-norm analysis method by distillation a comparison of both methods will be made. A validation of the Gibertini device will be made as well. Regarding to the reproducibility limits of the Alcohol analysis (set by OIV) the Gibertini device stays within the range. When it comes to the analysis of Volatile Acid, the Gibertini device achieves better results than the reference method. Regarding to the reproducibility limits of the Volatile Acid analysis (set by OIV) the Gibertini device stays as well within the range. The Gibertini device analyzes all over the measuring range as equivalent as the reference method when doing the comparison of the methods for the alcohol analysis and the Volatile Acid analysis. Since the “Limits of Agreement” in the Bland-Altman-plot were only slightly higher than the limits of maximum acceptable differences, the method with Gibertini can be confirmed as suitable to use. In summary, the capability of the Gibertini device can be affirmed.

Keywords: Alcoholometry, volatile acidity determination, method validation, method comparison, Bland-Altman, Gibertini, SUPER DEE, distillation

Vorbemerkung

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit für Agrarwissenschaften mit Schwerpunkt „Weinbau und Önologie“ wird für die „Mitteilungen Klosterneuburg“ ein Laborversuch durchgeführt. Dieser Laborversuch untersucht eine neue, möglicherweise verbesserte Analysenmethodik (SUPER DEE Gerät), im Vergleich zu den herkömmlich Methoden, für die Bestimmung von Alkohol und Flüchtiger Säure in Weinen.

Die als herkömmlich bezeichneten Methoden sind jene, welche von der OIV (*Internationale Organisation für Rebe und Wein*) als Normanalysenmethoden anerkannt sind. Das neuentwickelte elektronische Destillationsgerät SUPER DEE Gerät der italienischen Firma Gibertini soll, wie zuvor genannt, die herkömmliche Analysenmethodik deutlich verbessern. Um dies festzustellen werden eine Methodenvalidierung und ein Methodenvergleich durchgeführt. Für die Methodenvalidierung werden eine Präzisions-, Grundkalibrierungs- und die Wiederfindungsanalyse durchgeführt. Zum Methodenvergleich werden lediglich unterschiedlichen Weinproben analysiert und verglichen. Für sämtliche Analysen der Flüchtigen Säure in Weinen ist Mathias Regner zuständig und verantwortlich. Die Alkoholanalysen liegen in der Zuständigkeit von Julian Zeilinger. Dieser ist auch für dessen Ergebnisse zuständig. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Tabellenkalkulationsprogrammen und dem Statistikprogramm SQS. Für die Auswertung ist ebenfalls Julian Zeilinger zuständig.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
Alkohol und alkoholische Gärung.....	1
Bestimmungsmöglichkeiten von Alkohol in Weinen.....	2
Flüchtige Säuren.....	2
Bestimmungsmöglichkeiten von flüchtigen Säuren in Weinen.....	3
Validierung.....	5
Bland-Altman-Diagramm.....	6
Material und Methoden	8
Methodenvalidierung.....	8
Methodenvergleich.....	8
Überprüfung der Alkoholangabe am Etikett von 120 Weinen.....	8
Methoden zur Bestimmung des vorhandenen Alkohols.....	9
Methoden zur Bestimmung der flüchtigen Säure (gemessen als Essigsäure).....	9
Auswertung der Daten.....	10
Ergebnisse	11
Methodenvalidierung.....	11
Präzision.....	11
Grundkalibrierung	12
Wiederfindung	16
Methodenvergleich.....	18
Überprüfung der Alkoholangabe am Etikett.....	20
Diskussion.....	21
Literatur.....	23
Abbildungen.....	24

Einleitung

Weininhaltsstoffe sind jene Stoffe die einen Wein zu dem macht was er ist. Doch nicht alle dieser Weininhaltsstoffe haben einen positiven Einfluss auf die Weinqualität. Deshalb ist die analytische Bestimmung von Weininhaltsstoffen für die Herstellung von hochqualitativen Weinen in der heutigen Zeit nicht mehr wegzudenken. Mit den diversen Analysetechniken lassen sich mittlerweile all jene Parameter bestimmen, welche die größten Einflüsse auf die Weinqualität ausüben. Hierbei wird vor allem auf jene Parameter geachtet, welche die größten negativen Einflüsse auf die Weinqualität darstellen. An erster Stelle ist hier der Gehalt an flüchtiger Säure in Wein zu nennen. Doch auch Parameter, welche einen vorwiegend positiven Einfluss auf die Qualität aufzeigen, sind wichtig auf deren Gehalt zu prüfen. Hierbei ist der Gehalt an vorhandenem Alkohol zu nennen.

Für die Analyse dieser beiden Qualitätsparameter haben sich im Laufe der Geschichte der Weinherstellung viele Analysemethoden und Techniken entwickelt. Jedoch haben sie nach den nass-chemischen Methoden alle eines gemeinsam – einen Destillationsvorgang. Dabei wird der zu analysierende Inhaltsstoff aufgrund von Flüchtigkeit in ein Destillat übergeführt, in dem im Anschluss weitere chemische oder physikalische Bestimmungen erfolgen bis schlussendlich der gewünschte Wert vorliegt. Da dieser Vorgang der Destillation sehr zeitaufwändig ist entwickelte die Firma Gibertini ein Destillationsgerät namens SUPER DEE, welches diesen Vorgang um ein vielfaches beschleunigen soll. Dieses Gerät wurde auf deren Analysegenauigkeit mittels Methodenvalidierung und Methodenvergleich zu den akkreditierten OIV Methoden getestet.

Alkohol und alkoholische Gärung

Ein Wein besteht aus vielen verschiedenen Inhaltsstoffen. Grundsätzlich gib es jedoch einige Grundbestandteile die in jedem Wein zu finden sind. Zu diesen gehören Wasser, Zucker, Säuren, Phenole, Farbstoffe, Mineralstoffe, Tannine, Alkohole und aromatischen Verbindungen. Die Hauptkomponenten in Wein sind jedoch Wasser und Alkohol (NILOK, 2010). Der im Wein verhältnismäßig in der höchsten Konzentration vorkommende Alkohol ist der Ethylalkohol (RIBÉREAU-GAYON ET AL., 2006). Seine Konzentration hängt vorwiegend von der Ausgangskonzentration des vergärbaren Zuckers eines Mostes ab (MARGALIT, 1997). Neben Ethylalkohol kommen in Weinen auch geringe Mengen an Methylalkohol, höhere Alkohole, sowie als Ester gebundene Alkohole vor (TANNER und BRUNNER, 1979).

Alkohol in Weinen kann auf zwei natürliche Arten gebildet werden. Entweder durch den alkoholischen Gärprozess - Hauptprozess, oder durch parallel zu der alkoholisch Gärung ablaufende Nebenprozesse, welche in keinen direkten Zusammenhang mit dem Hauptprozess stehen (MARGALIT, 1997). Der als „alkoholische Gärung“ bezeichnete Prozess (Stoffumsatz - vorwiegend unter Luftabschluss, welcher von Mikroorganismen durchgeführt wird) ist der älteste bekannte Gärvorgang. Deshalb wird dieser Prozess auch als „Die Gärung“ schlechthin bezeichnet (JAKOB, 1995). Bei diesem Vorgang wird unter weitgehendem Luftabschluss Zucker, vor allem in Form von Glucose und Fructose zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid vergoren. Hauptverantwortlich für diesen mikrobiellen Vorgang sind Hefen, aber auch Bakterien können an diesen Gärprozessen beteiligt sein (MORENO-ARRIBAS und POLO, 2009). Anhand näherer Untersuchungen der Biochemie von Hefen konnte festgestellt werden, dass Zucker durch stufenweises Einwirken (Glykolyse) von Hefeenzymen zu Alkohol abgebaut wird. Durch eine von Gay-Lussac im Jahre 1810 aufgestellte vereinfachte Gärgleichung, welche nur Haupt- und Nebenprodukte kennzeichnet, kann der Gärvorgang leicht veranschaulicht werden (JAKOB, 1995).



	Hexosen	Ethanol	Kohlendioxid	Kalorien
Molmassen:	(180)	(92)	(88)	
Theoretische Ausbeute:		51,1%	48,9%	

Bei der alkoholischen Gärung wird nicht nur Zucker in Ethanol umgewandelt, es werden auch zahlreiche andere Gärungsnebenprodukte gebildet, welche den Wein positiv und negativ beeinflussen können. Nichts desto trotz kann man von einer anteilmäßigen Umwandlungsrate von Zucker in Alkohol (Ethanol) durch Hefen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* von 92 – 95% ausgehen (BOULTON ET AL. 1996). Grundsätzlich ist zu sagen, dass es sich bei diesem Vorgang um einen sehr komplexen handelt, wenn man den gesamten Prozess mit allen Nebenreaktionen betrachtet. Bedeutende Gärungsnebenprodukte neben den Hauptprodukten Ethanol und Kohlendioxid sind Glycerin, Brenztraubensäure (Pyruvat), Acetaldehyd (Ethanal), Bernsteinsäure, Fuselöle (höhere Alkohole), Essigsäure und Ester (MORENO-ARRIBAS und POLO, 2009; STEIDL, 2010).

Bestimmungsmöglichkeiten von Alkohol in Weinen

Je nach Genauigkeitsanforderung beziehungsweise Konzentrationsbereich sind unterschiedliche Methoden für die Bestimmung von Alkohol in Wein gebräuchlich. Zu den geläufigsten Bestimmungsmethoden zählt jedoch ein Destillationsschritt mit einer darauf folgenden physikalischen (Dichtebestimmung mittels Biegeschwinger oder Aräometer) oder chemischen (Oxidation mit Kaliumdichromat = Methode nach Rebelein) Bestimmungsmethode (TANNER und BRUNNER, 1979).

Die Bestimmung des Alkoholgehalts mittels Destillation beruht auf dem Prinzip Dichtemessung des extraktfreien Destillats eines Weines. Einflüsse von vorhandenen Begleitstoffen im Destillat wie zum Beispiel Ester oder Methanol können vernachlässigt werden. Die Alkoholbestimmung kann mittels Alkoholspindel, welche nach dem physikalischen Prinzip des Austriebes funktioniert, durchgeführt werden. Je alkoholreicher ein Destillat ist, desto tiefer sinkt die Alkoholspindel. Zu beachten ist die Temperatur des zu bestimmenden Destillates. Entweder das Destillat wird auf die Eichtemperatur der Spindel gebracht, oder der Temperaturunterschied zwischen Eichtemperatur und Destillat wird mithilfe einer Alkoholkorrekturtabelle, welche an der Alkoholspindel angebracht ist, abgeglichen (STEIDL, 2010).

Flüchtige Säuren

Die Gesamtheit an Säuren, welche sich durch Einwirkung von Wasserdampf verflüchtigen, wird als „flüchtige Säuren“ bezeichnet. Flüchtige Säuren bestehen aus verschiedenen Säuren wie zum Beispiel Ameisensäure, Propionsäure, höhere Fettsäuren (Capronsäure) und Essigsäure (TANNER und BRUNNER, 1979). Hinsichtlich Quantität und sensorischer Wahrnehmung ist die Essigsäure der bedeutendste Bestandteil der flüchtigen Säuren. Mit über 90% Anteil an den flüchtigen Säuren in Weinen ist sie die dominierende. (MORENO-ARRIBAS und POLO, 2009). Grundsätzlich ist der Gehalt an flüchtigen Säuren ein Qualitätsparameter für Weine. Umso hygienischer und genauer gearbeitet wird, umso geringen sind die Konzentrationen an flüchtiger Säure im hergestellten Wein. Hefen produzieren unter normalen Bedingungen wenig an flüchtigen Säuren. Produzierte Gehalte an

flüchtiger Säure reichen unter normalen Bedingungen von 0,2 - 0,4g/l. Szenarien wie zum Beispiel kalte Gärführung, zu hohe Zuckerkonzentrationen oder starker Luftkontakt während der Gärung können die Hefe in eine Stresssituation bringen, welche in einem Anstieg des flüchtigen Säuregehalts resultiert. Bis zu 0,6 g/l an flüchtige Säure können hierbei gebildet werden (LINSKENS und JACKSON, 1988; STEIDL, 2010).

Gesetzliche Grenzwerte in Österreich für flüchtige Säure in Weinen (berechnet als Essigsäure):

- Weißwein (inkl. Rosé), Qualitätsweine, Kabinettweine, Spätlese: 1,08g/l
- Rotweine, Qualitätsweine, Kabinettweine, Spätlese: 1,2g/l
- Beerenauslese und Eiswein: 1,8g/l
- Ausbruch, Trockenbeerenauslese und Stohwein: 2,4g/l
(DER WINZER, 2011)

Von „essigstichigen“ Weinen ist dann die Rede, wenn essigsäurebildende Bakterien darin tätig sind und deren Arbeit schon fortgeschritten ist. Essigsäure wird vorwiegend von Bakterien hergestellt. Dies macht den Gehalt an Essigsäure zu einem Qualitäts- und Hygieneparameter im Wein. Aufgrund dessen wurden auch Höchstgrenzen für den Gehalt an flüchtiger Säure – vorwiegend Essigsäure gesetzlich festgelegt (JAKOB, 1996).

Bestimmungsmöglichkeiten von flüchtigen Säuren in Weinen

Es sind mehrere Apparaturen zur genauen Bestimmung von flüchtiger Säure im Wein entwickelt worden. Prinzipiell eignen sich dafür alle Apparaturen die folgende Anforderungen erfüllen:

Anforderung 1: Der Wasserdampf, welcher in das Destillat übergeht sollte weitgehend CO₂ frei sein. Zumindest so frei von CO₂, dass in 250ml Destillat die entstehende Färbung mindestens 10 Sekunden lange anhält, nachdem man 0,1ml 0,1N Lauge und zwei Tropfen 1 prozentiger Indikatorlösung (Phenolphthaleinlösung) hinzugefügt hat.

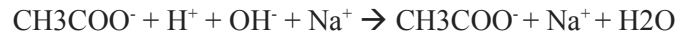
Anforderung 2: Es müssen sich nach der Überdestillation mindestens 99,5% der Essigsäure im Destillat wiederfinden.

Anforderung 3: Unter den gleichen Bedingungen wie bei *Anforderung 2*, dürfen bei der Destillation von 1N Milchsäure nur maximal 0,5% Milchsäure im Destillat wiederzufinden sein.

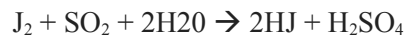
Mittels Destillation werden durch Wasserdampf die flüchtigen Säuren von der Weinprobe in ein Destillat überdestilliert. Die flüchtigen Säuren werden anschließend acidimetrisch bestimmt. Das Grundlegende Prinzip ist eine Neutralisationsanalyse. Hierbei wird eine unbekannte Konzentration an Säure mithilfe einer basischen Maßlösung, mit bekannter Konzentration, bestimmt. Dies erfolgt in mehreren Titrationsschritten, wobei nur die erste Titration acidimetrisch ist und die folgenden zwei Jodometrisch sind.

- 1. Titration: Es werden 2 Tropfen Phenolphthalein (Indikatorlösung) der Überdestillierten Weinprobe beigegeben. Anschließend erfolgt eine Titration mit Natronlauge (0,1mol/L). Die dabei ablaufende Reaktion wird als Säure – Basen Reaktion bezeichnet. Detaillierter gesagt reagiert hier eine schwache Säure mit einer starken Base. Nach Umschlagen des Weindestillats auf leicht rosa (pH 8,2) wird der Verbrauch an Natronlauge (0,1mol/L) an der Burette abgelesen. Der Gesamtgehalt an flüchtigen Säuren der Probe kann nun rechnerisch

bestimmt werden.



- 2. Titration: Nach erfolgter Ersttitration werden 4 Tropfen Salzsäure dem leicht rosa gefärbten Weindestillat hinzugefügt. Damit der pH-Wert des Weindestillats von alkalisch wieder auf sauer verschoben wird. Dies muss rasch erfolgen, da sich sonst gebundenes SO_2 freisetzt und sich verflüchtigen kann. Weiteres werden 2ml Stärkelösung (5g/L) und Kaliumjodidkristalle, welche als Reaktionsanreger agieren, zum Weindestillat zugesetzt. Die Titration wird mit einer Iodlösung (0,005M) durchgeführt. Überschüssiges J_2 lagert sich in die Stärkestruktur ein und bildet einen blauvioletten Komplex, scheinbar ist der Tritrationsendpunkt erreicht. Mithilfe dieser Titration lässt sich der Gehalt an freigesetzten SO_2 bestimmen, welcher in die rechnerische Bestimmung der flüchtigen Säuren miteinfließt.



- 3. Titration: Es erfolgt die Zugabe von Natriumtetrabromat (eine Wegwerf-Pipette voll). Dies hat zur Folge, dass der pH-Wert der Gesamtprobelösung in das basische übergeht. Das gebundene SO_2 wird somit freigesetzt. Nun kann das freigesetzte SO_2 wieder mit der Iodlösung (0,005M) titriert und somit bestimmt werden. Die Reaktionsgleichung ist analog zur 2. Titration.

Alle drei, von der Bürette abgelesenen Verbrauchswerte der Titrations fließen für die Berechnung zur Bestimmung der flüchtigen Säure berechnet als Essigsäure ein (EDER ET AL., 2004; OIV-MA-AS313-02).

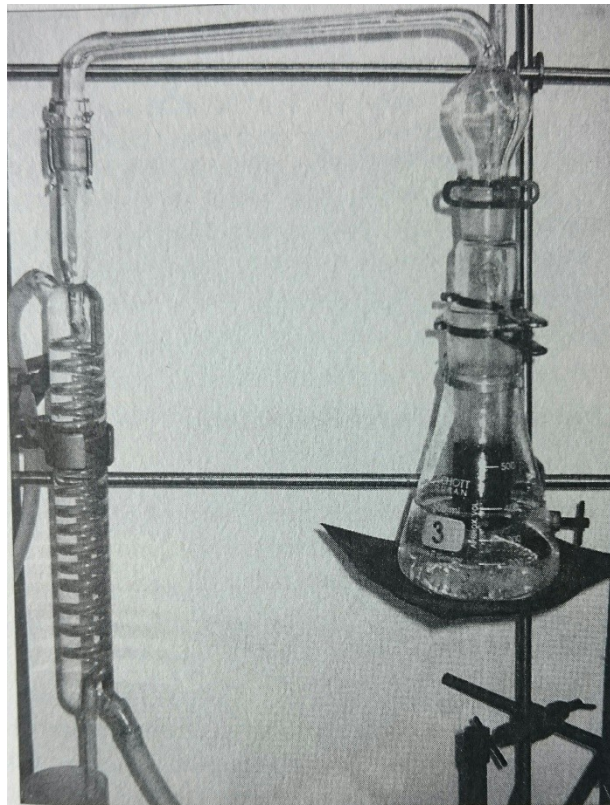


Abbildung 1: Woidich Apparatur (Eder et al., 2004).

Validierung

„Validierung ist der Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode“ (DERTINGER et al., 1984).

Ziel der Validierung ist, einen vollständigen Überblick über die Kenndaten einer Methode zu erhalten. Darüber hinaus sollen der Anwendungsbereich und die Limitierungen der Methode ersichtlich werden. Die Validierung bedient sich verschiedener Parameter (KROMIDAS, 2011)

Genauigkeit

Der Begriff Genauigkeit beschreibt die Abweichung der einzelnen Werte vom richtigen Wert. Dazu werden die systematischen und zufälligen Fehler gemeinsam betrachtet. Die Genauigkeit ist der Oberbegriff für die beiden Validierungsparameter Präzision und Richtigkeit (GERTZ, 1995).

Richtigkeit

„Die Richtigkeit von Werten bezieht sich auf die Übereinstimmung des Mittelwertes aus vielen Messungen mit der wahren Konzentration“ (GERTZ, 1995).

Der Abstand des Mittelwertes vom richtigen Wert wird durch die Größe der systematischen Fehler (bias) bestimmt. Der richtige Wert wird dabei als fehlerfrei angenommen (zertifiziertes Referenzmaterial). Dieser Abstand wird als systematische Ergebnisabweichung bezeichnet und ist das Maß der Richtigkeit. Als Lageparameter ist die Richtigkeit ein Mittel um die Abweichung der Messmethode vom wahren Wert zu errechnen (KROMIDAS, 2011).

Präzision

„Präzision ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander oder einfach ausgedrückt: das Maß für die Streuung von Analysenergebnissen.“ (KROMIDAS, 2011) Die Präzision gibt Aufschluss über den Grad der Streuung der einzelnen Messwerte um den Mittelwert. Dabei werden zufällige Fehler bewertet, die bei der Anwendung eines festgelegten Ermittlungsverfahrens und unter vorgegebenen Bedingungen entstehen. Die Präzision ist ein Streuparameter und wird durch die Standardabweichung beschrieben. Sie kann mittels mehreren Methoden erfolgen.

Wird dieselbe Probe mehrmals in kurzer Zeit unter gleichbleibenden Bedingungen (Wiederholbedingungen) durchgeführt, so spricht man von einer Wiederholpräzision (engl. repeatability). Diese kann außerdem als „Präzision von Serie zu Serie“ (intra-day) oder „Präzision von Tag zu Tag“ (inter-day). Hierbei handelt es sich um Wiederholpräzisionen die in verschiedenen Serien an einem Tag (intra-day) oder z.B. an 6 aufeinanderfolgenden Tagen (inter-day) erfolgen.

Wird dieselbe Probe mit demselben Verfahren in unterschiedlichen Labors (Vergleichsbedingungen) durchgeführt, so spricht man von Vergleichspräzision.

Wird dieselbe Probe innerhalb eines Labors mehrmals unter Veränderung eines Parameters (Bearbeiter, Gerät, Tageszeit bzw. Reagenzien anderer Charge), so spricht man von Laborpräzision oder laborinterner Vergleichspräzision (engl. reproducibility) (KROMIDAS, 2011).

Wiederfindung

„Die Wiederfindung oder Wiederfindungsrate ist das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe.“

Die Wiederfindung beschreibt den Substanzverlust während der gesamten Methode und wird in Prozent angegeben. Der bestmögliche Wert liegt bei 100% (KROMIDAS, 2011).

Linearität und Arbeitsbereich

Werden quantitative Bestimmungen durchgeführt so ergibt sich fast immer eine Korrelation zwischen der Menge des Analyten und dem Informationswert. Innerhalb eines bestimmten Messbereiches kann dieser Zusammenhang linear (proportional und mathematisch definierbar) angenommen werden. Die Linearität wird dabei als die Fähigkeit definiert, mit der dieser Zusammenhang als Geradengleichung (lineare Regression) beschrieben werden kann (GERTZ, 1995; KROMIDAS, 2011).

Der Arbeitsbereich kann aus der Linearität abgeleitet werden und beschreibt den Konzentrationsbereich des Analyten in einer Probe, der ein akzeptables Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität gewährleistet (KROMIDAS, 2011).

Bland-Altman-Diagramm

Das von Bland und Altman beschriebene Bland-Altman-Diagramm wird verwendet, um die Übereinstimmung zweier quantitativer Messungen zu beurteilen. Für die Bewertung werden hauptsächlich der Mittelwert der Differenzen (d) und die Standardabweichung der Differenzen (s) zwischen zwei Messungen benötigt.

Die grafische Darstellung ermöglicht dabei eine leichtere Interpretation. Der resultierende Graph ist ein Streudiagramm mit den Achsen X und Y, wobei die Datenpunkte in der Y-Achse die Differenz der beiden Messungen ($A-B$) und auf der X-Achse der Mittelwert der Messungen ($(A+B)/2$) darstellt. Bei der ursprünglichen Methode nach Bland und Altman wird also die Differenz eines Wertepaares gegen den Mittelwert eines Wertepaares aufgetragen. Mit dieser Methode kann die Verbindungen zwischen Messfehler und dem wahren Wert beurteilt werden, wobei der wahre Wert durch den Mittelwert der Messungen approximiert wird. Im Gegensatz dazu ist es ebenfalls möglich, die Differenzen nur gegen einer der beiden Methoden aufzutragen, wenn diese eine Referenzmethode oder den "Goldstandard" darstellt. Diese Methode wird jedoch kontroversiell betrachtet, da zwischen der Differenz der Messungen und dem Wert auf der X-Achse immer der Anschein einer Verbindung entsteht, obwohl diese nicht besteht.

Der erste Punkt zur Bewertung für die Übereinstimmung zweier Methoden im Bland-Altman-Diagramm stellt der Mittelwert der Differenzen dar und wird als horizontale Linie aufgetragen. In einem idealen Modell wären die einzelnen Messungen von gleichem Wert und somit alle Differenzen 0. Durch zufällige und systematische Messfehler weichen die Messwerte innerhalb der Methoden ab und es entsteht eine Vielzahl an unterschiedlicher Differenzen. Während bei rein zufälligen Messfehlern der Mittelwert aller Differenzen bei 0 liegen sollte, zeigt sich ein systematischer Messfehler in Abweichung davon. Um spezifische, messgrößenabhängige Abweichungen auszuschließen, sollten die einzelnen Differenzen zusätzlich im Bezug zur Messgröße auf der X-Achse beurteilt werden.

Der zweite Punkt zur Beurteilung des Bland-Altman-Diagramms stellen die sogenannten „Limits of Agreement“ dar. Nach Bland und Altman sollten 95% der Datenpunkte innerhalb der zweifachen Standardabweichung der Differenzen ($\pm 2s$) liegen. Das obere und untere „Limit of Agreement“ werden somit durch $d+1,96*s$ und $d-1,96*s$ definiert. Als grundlegende Bedingung für diese Annahme gilt die Normalverteilung der Differenzen. Die „Limits of Agreement“ werden ebenfalls als horizontale Linie aufgetragen und geben Auskunft über die Schwankungsbreite der Abweichungen.

Mithilfe des Bland-Altman-Diagramms können zwar systematische Fehler und die Schwankungsbreite, in der 95% der Differenzen zwischen zwei Messwerten liegen, bestimmt

werden, eine Aussage über die Eignungsfähigkeit beziehungsweise Verwendungsfähigkeit der Methoden kann jedoch nicht getroffen werden. Um die Verwendungsfähigkeit der Methoden zu beurteilen wurde deshalb das Prinzip des „a priori Kriteriums“ eingeführt. Dazu wird vor den Messungen (a priori) ein maximal akzeptables Limit für die Schwankungsbreite der Differenzen (erwartetes „Limit of Agreement“), basierend auf analytisch relevanten Kriterien, eingeführt und nach Erstellung des Bland-Altman-Diagramms mit den „Limits of Agreements“ verglichen. Ob dieses „a priori Kriterium“ eingehalten werden kann oder nicht (vgl. GIAVARINA, 2015)

Material und Methoden

Die für die Alkohol- und flüchtigen Säure Bestimmungen verwendeten Weine stammten aus der Weinsammlungen der HBLA und BA für Wein- und Obstbau in Klosterneuburg.

Für die Untersuchungen wurden die Gibertini SUPER DEE Destillationsapparatur inklusive der zugehörigen Chemikalien und Reagenzien, die hydrostatische Waage SUPER ALCOMAT inklusive der zugehörigen Reagenzien, 4 Woidich Apparaturen inklusive der nach OIV-Norm vorgeschriebenen Chemikalien und Reagenzien für den Versuchsvorgang nach *OIV-MA-AS313-02*, die Destillationskolben inklusive der Chemikalien und Reagenzien für den Versuchsvorgang nach *OIV-MA-AS312-01A* verwendet. Die Aufstockungsreihen wurden mit Isopropanol (99,9%) und Essigsäure (99,9%) hergestellt.

Methodenvalidierung

Bei der Bestimmung der flüchtigen Säure wurde vor Versuchsbeginn die Präzision der Gibertini Apparatur und der akkreditierten Referenzmethode mittels 10-facher Analyse derselben Probe bestimmt. Für die Bestimmung des Alkohols wurde nur eine Präzision der Gibertini Aeschpparatur durchgeführt, da die Alkoholbestimmung eine Routineanalyse darstellt.

Die Grundkalibrierung und Wiederfindung wurden mittels 6x6 Matrix bestimmt. Dafür werden jeweils ein Ausgangswein mit niedrigem Alkoholgehalt und flüchtiger Säure verwendet. Diese "Grundweine" werden in weiterer Folge fünfmal mit genau bestimmten Additionen an reinem Alkohol beziehungsweise Essigsäure aufgestockt. Mit dem unveränderten Ausgangswein sind somit jeweils 6 Proben mit unterschiedlicher Konzentration (Alkoholgehalt und Gehalt an flüchtiger Säure) vorhanden.

Tabelle 1: Aufstockungskonzentrationen der 6x6 Matrix

	Aufstockungskonzentration
Alkohol (Isopropanol 99,9%)	0,29 Vol.-%
Flüchtige Säure (Essigsäure 99,9%)	0,20 g/l

Diese Probenreihe wurde anschließend jeweils an 6 Tage analysiert (6x6). Validiert wurden bei der flüchtigen Säurebestimmung die akkreditierte Methode mit der Woidich Apparatur (*OIV-MA-AS313-02*) sowie die Gibertini Apparatur. Bei der Bestimmung des Alkohols wird nur die Gibertini Apparatur validiert.

Methodenvergleich

Bei dem Methodenvergleich wurden die akkreditierten OIV-Normen zur Bestimmung von Alkohol und flüchtiger Säure mit den Gibertini Apparatur-Bestimmungsmethoden verglichen. Zur statistischen Auswertung wurde ein Diagramm nach Bland Altman erstellt.

Überprüfung der Alkoholangabe am Etikett von 120 Weinen

Mittels Gibertini Apparatur wurde darüber hinaus die Richtigkeit der Alkoholangabe am Etikett von 120 Weinen überprüft. Dazu stand zusätzlich die hydrostatische Waage SUPER ALCOMAT von Gibertini zur Verfügung, mit welcher der vorhandene Alkohol (Vol.-%) bestimmt werden konnte. Zusätzlich wurden die erhobenen Werte mit den Ergebnissen des FTIR-Spektrometers verglichen.

Methoden zur Bestimmung des vorhandenen Alkohols

Destillativ - Versuchsvorgang nach OIV-MA-AS312-01A

Von der zu untersuchenden Weinprobe werden mithilfe eines Kolbens 100ml Wein entnommen und in den für die Alkoholbestimmung bestimmten Destillationskolben übergeführt. Nach der Überführung wird der Kolben noch zweimal mit destilliertem Wasser in den Destillationskolben hinein ausgespült. In den Destillationskolben werden dem Wein etwas Bentonit (1/4 Esslöffel), 1-2 Tropfen Antischaum, Siedesteinchen und 5ml Calciumhydroxid ($2mCa(OH)_2$) hinzugegeben. Anschließend wird Destillationskolben mittels (Schliffverbindungen mit Fixierschraube) an der Destillationsapparatur befestigt. Derselbe, zuvor verwendete 100ml Kolben wird unter dem Destillationsrohr positioniert und anschließend wird die Wasserkühlung aktiviert. Nachdem 80% des Destillationsvorgangs abgeschlossen sind (80 von 100ml Destillat übergeführt) wird der Destillationsvorgang beendet indem die Hitzequelle ausgeschaltet wird. Nachkommende Destillattropfen werden noch im Kolben aufgefangen. Der Kolben wird anschließend bis zur 100ml Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Bestimmung des Alkohols erfolgt ausschließlich mit der hydrostatischen Waage SUPER ALCOMAT von Gibertini.

Gibertini – SUPER DEE

Es werden exakt 100ml Wein von der zu untersuchenden Weinprobe in einen Spezialkolben der Firma Gibertini übergeführt. Diese 100ml werden anschließend in der Destillationskammer des SUPER DEE vorgelegt. Der Spezialkolben wird nach der Überführung des Weines mit destilliertem Wasser, welches ebenfalls in die Destillationskammer gespült wird, ausgespült und anschließend als Destillatgefäß in der am SUPER DEE - Gerät dafür vorgesehene Halterung befestigt. Vor dem Start des Destillationsvorgangs werden der Destillationskammer mit dem vorgelegten Wein noch 2-3 Tropfen Antischaum und 2-4 ml Calciumoxid 12% ($2m(CaO)$) hinzugefügt. Die Destillationskammer wird mittels Gummistopfen luftdicht verschlossen und mit folgender Auswahl am Display: MODE → ALCOHOL → MODE 80 → START die Destillation gestartet. Laut Auswahl werden 80ml (entspricht 80%) überdestilliert bevor der Vorgang beendet wird. Nach Erreichen der 80ml beendet das Gerät den Destillationsvorgang automatisch. Der Spezialkolben mit 80ml Destillat wird mit destilliertem Wasser auf 100ml aufgefüllt. Die Bestimmung des Alkohols erfolgt ausschließlich mit der hydrostatischen Waage SUPER ALCOMAT von Gibertini.

Methoden zur Bestimmung der flüchtigen Säure (gemessen als Essigsäure)

Destillativ - Versuchsvorgang nach OIV-MA-AS313-02

Die zu untersuchende Weinprobe wird zuerst durch ein hartes Filter filtriert, um die Kohlensäure zu entfernen. Anschließend werden exakt 20ml Filtrat mittels Vollpipette in die Siedekammer der Destillationsapparatur übergeführt. Zusätzlich wird dem Wein in der Siedekammer 0,5g Weinsäure und einige Siedesteinchen beigegeben. Anschließend wird der Kolben, welcher die Siedekammer umgibt, mit Wasser gefüllt und dicht mit der Destillationsapparatur mittels Schliffverbindungen und

Fixierschraube verbunden. Ein 250ml Kolben wird unter dem Destillationsrohr positioniert. Nach Einschalten der Wasserkühlung und aktivieren der Hitzequelle, welche das Wasser im Kolben zum Kochen bringt, beginnt die Destillation. Nach der Überdestillation von 250ml kann der Destillationsvorgang beendet werden. Dem 250ml Destillat werden 4 Tropfen Phenolphthalein Lösung als Indikator hinzugefügt und anschließend mit 0,1n Natronlauge auf eine leichte, 10 Sekunden anhaltende Rosafärbung titrieren. Dieser Wert wird als X Wert notiert. In weiterer Folge wird die Lösung mit 4 Tropfen Salzsäure wieder neutralisiert. Zusätzlich werden 2ml Stärkelösung und eine halbe Spatelspitze Kaliumjoditkristalle hinzugefügt und mit einer 0,005 M Iodlösung auf hellviolett titriert. Hierbei wird der freie Schwefeldioxid Gehalt ermittelt. Dieser Wert wird als Y Wert notiert. Nach dieser Titration werden der Lösung 1-3ml Natriumtetrabromat beigemischt – die Lösung erscheint wieder Rosa. Es folgt eine weitere Titration mit der 0,005 M Iodlösung auf hellviolett. Bei dieser Titration wird der Gehalt an gebundenen Schwefeldioxid bestimmt. Dieser Wert wird als Z Wert vermerkt. Die Berechnung der flüchtigen Säure, berechnet als Essigsäure, erfolgt nach der Formel $0,300 * (X - 0,1*Y - 0,05*Z)$.

Gibertini – SUPER DEE

20ml entcarbonisiertes Filtrat einer Weinprobe wird mittels Vollpipette in die Destillationskammer des SUPER DEE Geräts vorgelegt. Anschließend wird die Destillationskammer mittels Gummistopfen luftdicht verschlossen. Ein 250ml Kolben wird als Destillatgefäß an der dafür vorgesehenen Halterung befestigt. Am Display sind folgende Einstellungen zu tätigen: MODE → VOLATILE → MODE 240 → START. Die Destillation startet. Nach Überführung von 240ml Destillat stoppt das Gerät automatisch. Die weitere Vorgehensweise ist konform zur „Destillativ - Versuchsvorgang nach *OIV-MA-AS313-02* Methode.

Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SQS (Ausreißertest nach Grubbs, statistische Kennwerte der Präzision/Kalibriergeraden, Test auf Linearität, Arbeitsbereich, Grafische Darstellung der Kalibriergeraden). Zusätzlich wurde mit einem Tabellenkalkulationsprogramm gearbeitet (Kalibrierpunkte der 6x6 Aufstockungsmatrix, sowie die grafischen Darstellungen des Bland-Altman-Diagramms, der Wiederfindung und relativen Standardabweichung der 6x6 Matrix und des Häufigkeitsdiagramms der 120 Weine).

Ergebnisse

Methodenvalidierung

Präzision

Bei der Bestimmung des Alkohols, sowie der flüchtigen Säure wurde vor Versuchsbeginn die Präzision der Gibertini Apparatur und der akkreditierten OIV-Norm mittels mehrmaliger Analyse derselben Probe bestimmt. Dabei erfolgten an zwei Tagen jeweils 10 Messungen. Zusätzlich wurde durch einen anderen Analytiker, an einem gesonderten Tag, eine Laborpräzision durchgeführt. Mittels SQS wurden Ausreißer eliminiert (Ausreißertest nach Grubbs) und die Kenndaten Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung bzw. Variationskoeffizient berechnet.

Alkohol (Gibertini)

Tabelle 2: Ergebnistabelle der Präzisionsmessung

Präzision	\bar{x} (Vol.-%)	s (Vol.-%)	V_K (%)	n	Ausreißer
Wiederholmessung 1 (Analytiker 1)	12,29	0,047	0,44	10	-
Wiederholmessung 2 (Analytiker 1)	12,41	0,054	0,3	10	-
Wiederholmessung Interday	12,35	0,077	0,62	20	-
Wiederholmessung 3 (Analytiker 2)	12,34	0,047	0,38	10	1
Vergleichsmessung	12,35	0,068	0,55	30	1

\bar{x} (arithmetisches Mittel); s (Standardabweichung); V_K (relative Standardabweichung, Variationskoeffizient); n (Stichprobenmenge)

In den Resolutionen der OIV zur Methode *OIV-MA-AS312-01A* der Alkoholbestimmung wurden für die statistischen Kennwerte Vertrauensparameter festgelegt. Die Standardabweichung der Vergleichbarkeit wird mit 0,026 Vol.-% beziffert. Die Standardabweichung der Wiederholbarkeit liegt bei 0,082 Vol.-%. Während in den Wiederholmessungen leicht höhere Werte auftraten, konnte in der Vergleichsmessung ein sehr gutes Ergebnis innerhalb der Vertrauensparameter der OIV erreicht werden.

Flüchtige Säure (Gibertini)

Tabelle 3: Ergebnistabelle der Präzisionsmessung

Präzision	\bar{x} (g/l)	s (g/l)	V_K (%)	n	Ausreißer
Wiederholmessung 1 (Analytiker 1)	0,26	0,015	3,78	10	-
Wiederholmessung 2 (Analytiker 1)	0,30	0,010	4,83	10	-
Wiederholmessung Interday	0,28	0,025	8,84	20	-
Wiederholmessung 3 (Analytiker 2)	0,31	0,012	3,81	10	-
Vergleichsmessung	0,29	0,025	8,61	30	-

\bar{x} (arithmetisches Mittel); s (Standardabweichung); V_K (relative Standardabweichung, Variationskoeffizient); n (Stichprobenmenge)

Flüchtige Säure

Tabelle 4: Ergebnistabelle der Präzisionsmessung

Präzision	\bar{x} (g/l)	s (g/l)	V_K (%)	n	Ausreißer
Wiederholmessung 1 (Analytiker 1)	0,28	0,013	4,65	10	1
Wiederholmessung 2 (Analytiker 1)	0,25	0,020	7,79	10	0
Wiederholmessung Interday	0,27	0,022	8,19	20	1
Wiederholmessung 3 (Analytiker 2)	0,27	0,034	12,69	11	-
Vergleichsmessung	0,27	0,027	10,00	31	1

\bar{x} (arithmetisches Mittel); s (Standardabweichung); V_K (relative Standardabweichung, Variationskoeffizient); n (Stichprobenmenge)

Innerhalb der erlaubten Laborkennzahlen der akkreditierten Prüfstelle liegt die maximale erlaubte Abweichung der Vergleichbarkeit bei 0,08 g/l und für die Wiederholbarkeit 0,04 g/l. Die Methoden sind somit sehr präzise (vgl. PATZL- FISCHERLEITNER et al., 2016).

Grundkalibrierung

Die Ermittlung der Kalibriergeraden erfolgte mittels Aufstockverfahren (6x6), wobei die gemessenen Werte (Response) gegen die bekannte Konzentration der Weine aufgetragen wurden. Die Daten wurden mit dem Statistikprogramm SQS ausgewertet.

Alkohol (Gibertini)

Die Kalibrationspunkte der linearen Regression ergeben sich aus den errechneten Alkoholgehalten der aufgestockten Weine, sowie aus den Mittelwerten der gemessenen Proben.

Tabelle 5: Kalibrierungstabelle der 6x6 Matrix

	Kalibrier- substanz	1. Addition	2. Addition	3. Addition	4. Addition	5. Addition
Alkoholgehalt (Vol.-%)	10,76	11,04	11,33	11,62	11,9	12,19
Response (Vol.-%)	10,76	10,95	11,23	11,5	11,71	11,93

Für die genauere Betrachtung der Kalibrierungsdaten siehe Kapitel Wiederfindung.

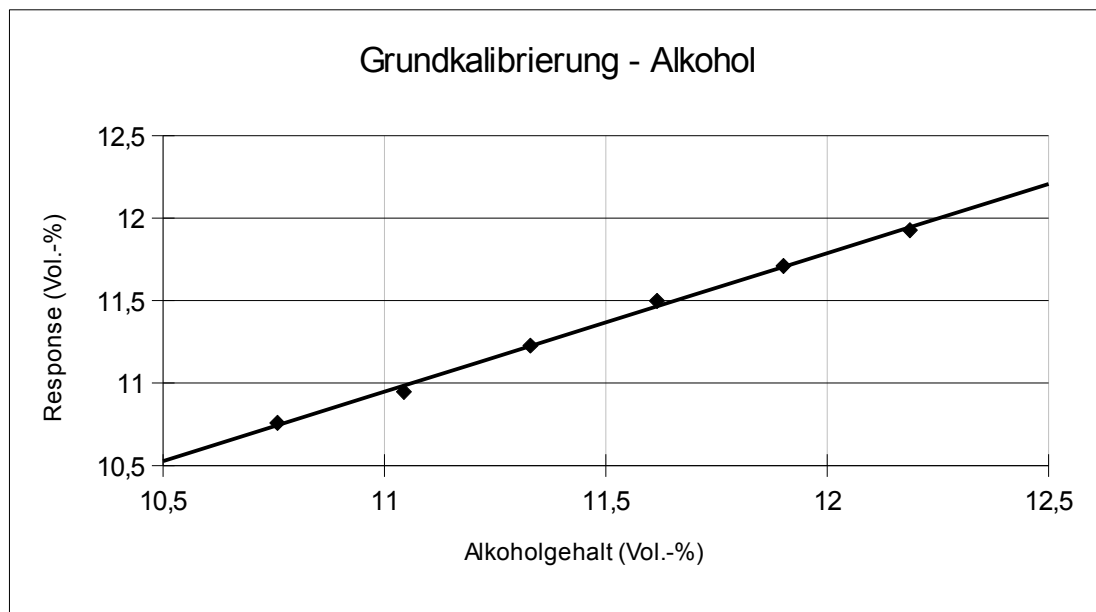


Abbildung 2: Grundkalibrierung Alkohol: Die Grafik zeigt die mittels Gibertini Apparatur gemessenen Werte in Abhängigkeit zu den errechneten Werten aus dem Aufstockungsverfahren.

In Abbildung 1 zeigt sich eine schöne lineare Funktion. Das SQS konnte die Linearität durch den Anpassungstest nach Mandel ebenfalls gegenüber der quadratischen Regression bestätigen. Die Steigung ist ein wenig zu gering, während der Ordinationsabschnitt mit 1,7 zu hoch liegt. Der Grund dafür könnte in den fehlenden Messwerten zwischen 10,75 und 0 liegen. Dadurch erscheint die Funktion etwas verzerrt.

Tabelle 6: Statistische Kennwerte der Grundkalibrierung

a	b	r	r ²	V _{x₀}
1,7040	0,8403	0,9985	0,9969	0,29%

a (Ordinationsabschnitt); b (Steigung); r (Korrelationskoeffizient); r² (Bestimmtheitsmaß), V_{x₀} (Verfahrensstandardabweichung)

Der Korrelationskoeffizient lässt Rückschlüsse auf die Stärke des linearen Zusammenhanges zwischen Größen ziehen. Er beschreibt die Anpassung eines mathematischen Modells an die experimentell ermittelten Werte. Der Koeffizient schwankt zwischen +1 und -1, wobei der

Zusammenhang umso höher ist, umso näher der Wert bei +1 beziehungsweise -1 liegt. Die errechnete Korrelation lässt sich demnach als gut bezeichnen.

Mithilfe der relativen Verfahrensstandardabweichung oder Verfahrensvariationskoeffizienten lässt sich zusätzlich die Präzision der Kalibrationsmessung um die Ausgleichsgerade beschreiben.

Hier konnte ein sehr genauer Wert erreicht werden. Aus den Ergebnissen der Kalibriergeraden lässt sich direkt aus der Festlegung der Kalibrationspunkte bestimmen. Nachdem in der Grundkalibrierung für den Alkoholgehalt die Linearität zwischen der niedrigste und höchsten Konzentration bestätigt wurde, gilt der Arbeitsbereich in diesem Bereich als bestätigt (vgl. KROMIDAS, 2011)

Flüchtige Säure (Gibertini)

Die Kalibrationspunkte der linearen Regression ergeben sich aus den errechneten Gehalten an flüchtiger Säure der aufgestockten Weine, sowie aus den Mittelwerten der gemessenen Proben.

Tabelle 7: Kalibrierungstabelle der 6x6 Matrix

	Kalibrier- substanz	1. Addition	2. Addition	3. Addition	4. Addition	5. Addition
Flüchtige Säure (g/l)	0,34	0,54	0,74	0,94	1,14	1,34
Response (g/l)	0,34	0,55	0,79	1,01	1,2	1,45

Für die genauere Betrachtung der Kalibrierungsdaten siehe Kapitel Wiederfindung.

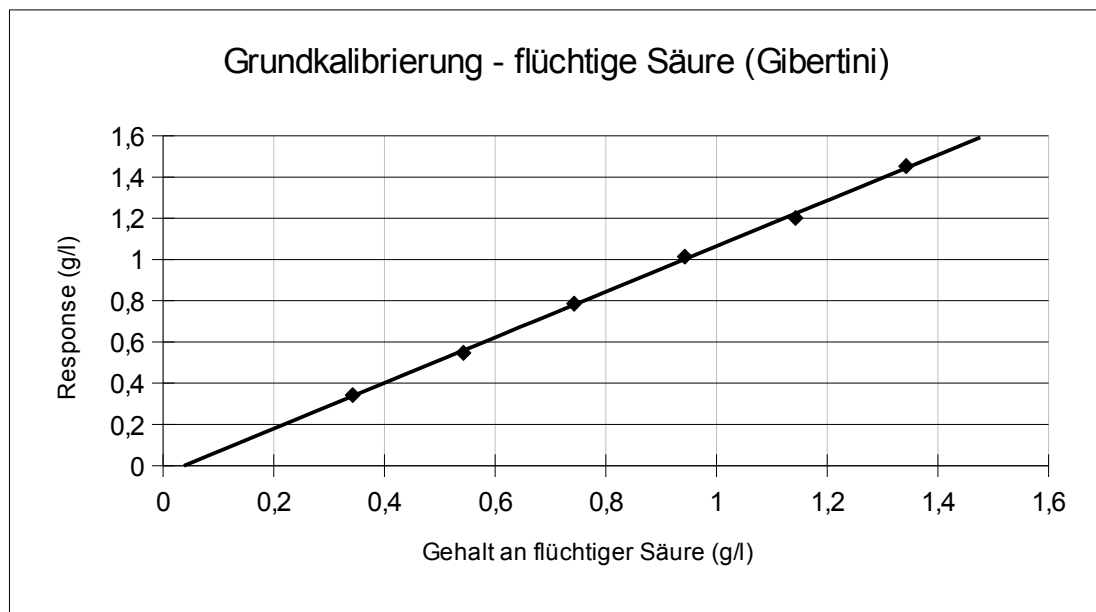


Abbildung 3: Grundkalibrierung flüchtige Säure: Die Grafik zeigt die mittels Gibertini Apparatur gemessenen Werte in Abhängigkeit zu den errechneten Werten aus dem Aufstockungsverfahren.

Hier zeigt sich eine gute lineare Funktion. Die Linearität konnte mittels Anpassungstest nach Mandel bestätigt werden. Um die Regressionsgerade zeigt sich nur eine geringe Abweichung der Kalibrationspunkte. Die Steigung der Geraden ist gut an 1 angenähert, auch der Ordinationsabschnitt bleibt nur knapp neben 0.

Tabelle 8: Statistische Kennwerte der Grundkalibrierung

a	b	r	r ²	V _{x0}
1,1062	-0,0410	0,9995	0,9990	1,59%

a (Ordinationsabschnitt); b (Steigung); r (Korrelationskoeffizient); r² (Bestimmtheitsmaß), V_{x0} (Verfahrensstandardabweichung)

Die Korrelation ist mit 0,9995 außerordentlich zufriedenstellend. Auch der Variationskoeffizient ist genau. Der Arbeitsbereich konnte wiederum zwischen der höchsten und der niedrigsten Konzentration bestätigt werden.

Flüchtige Säure

Die Kalibrationspunkte der linearen Regression ergeben sich aus den errechneten Gehalten an flüchtiger Säure der aufgestockten Weine, sowie aus den Mittelwerten der gemessenen Proben.

Tabelle 9: Kalibrierungstabelle der 6x6 Matrix

	Kalibrier- substanz	1. Addition	2. Addition	3. Addition	4. Addition	5. Addition
Flüchtige Säure (g/l)	0,27	0,47	0,67	0,87	1,07	1,27
Response (g/l)	0,27	0,58	0,76	0,99	1,22	1,45

Für die genauere Betrachtung der Kalibrierungsdaten siehe Kapitel Wiederfindung.

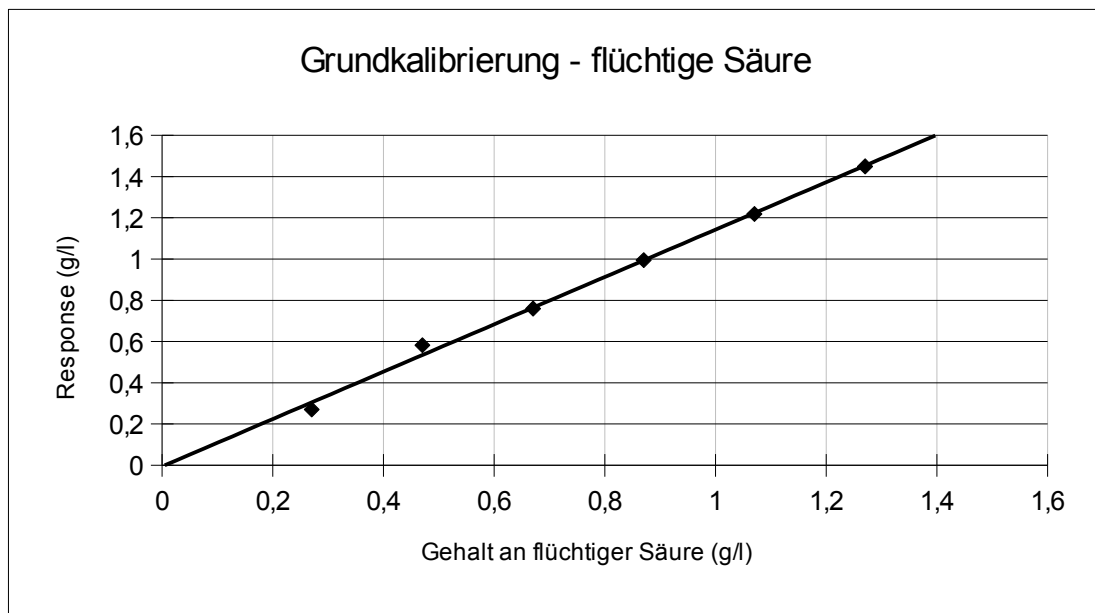


Abbildung 4: Grundkalibrierung flüchtige Säure: Die Grafik zeigt die mittels Gibertini Apparatur gemessenen Werte in Abhängigkeit zu den errechneten Werten aus dem Aufstockungsverfahren.

Auch bei der OIV-Referenzmethode liegt eine gute lineare Funktion vor. Die ersten beiden Messungen streuen jeweils entgegengesetzt um die Kalibriergerade, die restlichen Werte weisen jedoch nur sehr geringe Abweichungen auf. Die Steigung ist minimal höher als bei der Methode mit der Apparatur von Gibertini, während der Wert für den Ordinationsabschnitt hier jedoch nahezu perfekt ist.

Tabelle 10: Statistische Kennwerte der Grundkalibrierung

a	b	r	r ²	V _{x0}
1,1482	-0,0053	0,9981	0,9962	3,36%

a (Ordinationsabschnitt); b (Steigung); r (Korrelationskoeffizient); r² (Bestimmtheitsmaß), V_{x0} (Verfahrensstandardabweichung)

Die Korrelation zeigt wieder einen akzeptablen Wert an. Der Variationskoeffizient ist noch immer genau, verdoppelt sich jedoch im Hinblick auf die Vergleichsmethode mittels Gibertini. Der Arbeitsbereich konnte wiederum zwischen der niedrigsten und der höchsten Konzentration bestätigt werden.

Wiederfindung

Für die Darstellung des Verhältnisses aus den Mittelwerten der Proben und den richtigen Werten aus der Grundkalibrierung wurde die Wiederfindung verwendet. Die Grundlage zur Überprüfung der Wiederfindung bildeten die Daten des 6x6 Aufstockverfahrens. Dabei wurde für jede Konzentrationsstufe sowohl die Wiederfindung als auch die relative Standardabweichung ermittelt. Die Berechnung und Erstellung der Diagramme erfolgte mittels Open Office Calc.

Wiederfindung - Alkohol (Gibertini)

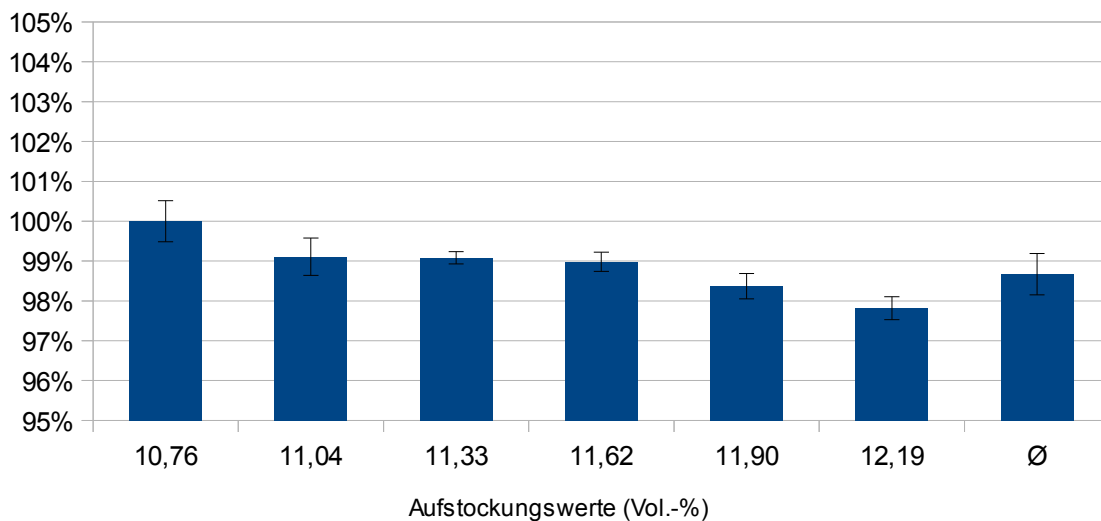


Abbildung 5: Wiederfindungsraten in den einzelnen Aufstockungskonzentrationen, sowie im Durchschnitt. Zusätzlich wird die relative Standardabweichung der einzelnen Messreihen angezeigt.

Bei der Wiederfindungsrate der Alkoholkonzentration mittels der Gibertini Apparatur wurden gute Ergebnisse erzielt. Die ermittelten Werte liegen alle minimal unter der bestmöglichen Wiederfindung von 100%. Insgesamt konnte eine hohe Annäherung und Konstanz erreicht werden, nur bei den letzten beiden Aufstockungen sinkt die Wiederfindung etwas. Der durchschnittliche Wert liegt bei 98,67%. Die relative Standardabweichung ist bei den einzelnen Messreihen ebenfalls zufriedenstellend klein.

Wiederfindung - flüchtige Säure (Gibertini)

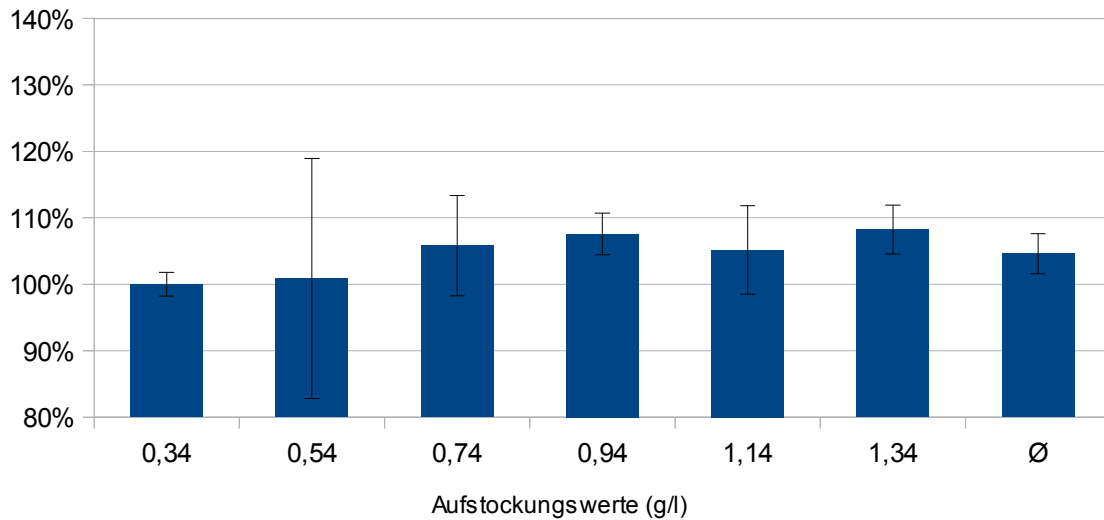


Abbildung 6: Wiederfindungsraten in den einzelnen Aufstockungskonzentrationen, sowie im Durchschnitt. Zusätzlich wird die relative Standardabweichung der einzelnen Messreihen angezeigt.

Die Wiederfindungsrate der flüchtigen Säure mit der Gibertini Apparatur weist eine geringe Abweichung <10 % auf. Über die gesamte Messreihe gesehen lassen sich leicht erhöhte Ergebnisse erkennen, die Ergebnisse bleiben aber konstant. Die durchschnittliche Wiederfindung liegt bei 104,61%. Bis auf die 2. Aufstockkonzentration, mit einem Wert von 19,8%, ist die relative Standardabweichung akzeptabel.

Wiederfindung - flüchtige Säure

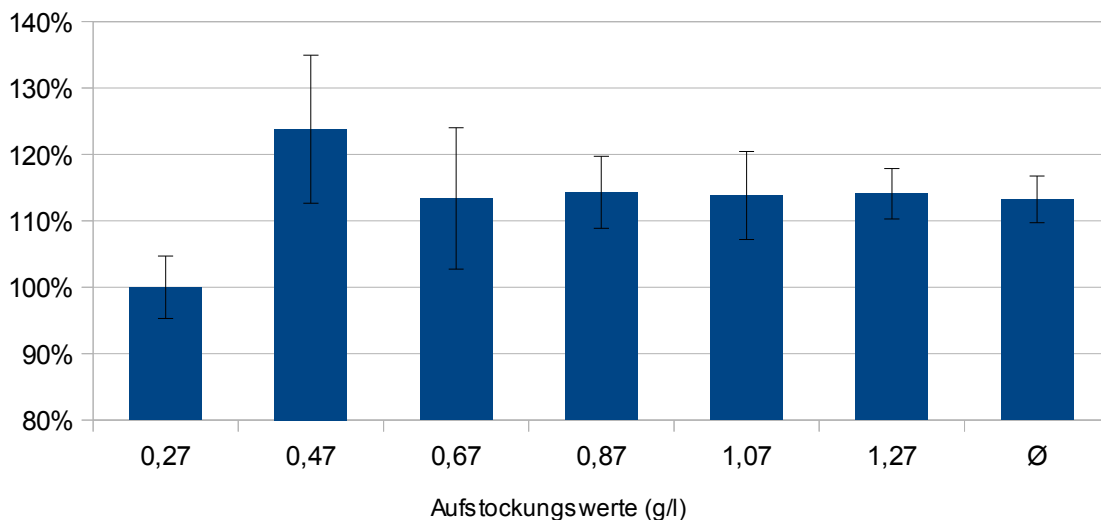


Abbildung 7: Wiederfindungsraten in den einzelnen Aufstockungskonzentrationen, sowie im Durchschnitt. Zusätzlich wird die relative Standardabweichung der einzelnen Messreihen angezeigt.

Die Wiederfindung der flüchtigen Säure mittels der OIV-Referenzmethode verhält sich ähnlich zu der Methode mit der Gibertini Apparatur. Während die restlichen Werte konstant bei zirka 110%

liegen, schlägt die 2. Messreihe mit 123% etwas nach oben aus. Die durchschnittliche Wiederfindung liegt bei 113,24%. Die relative Standardabweichung bleibt über den gesamten Bereich sehr klein.

Methodenvergleich

In diesem Abschnitt wurden die akkreditierten OIV-Normen zur Bestimmung von Alkohol und flüchtiger Säure mit den Gibertini Apparatur-Bestimmungsmethoden verglichen.

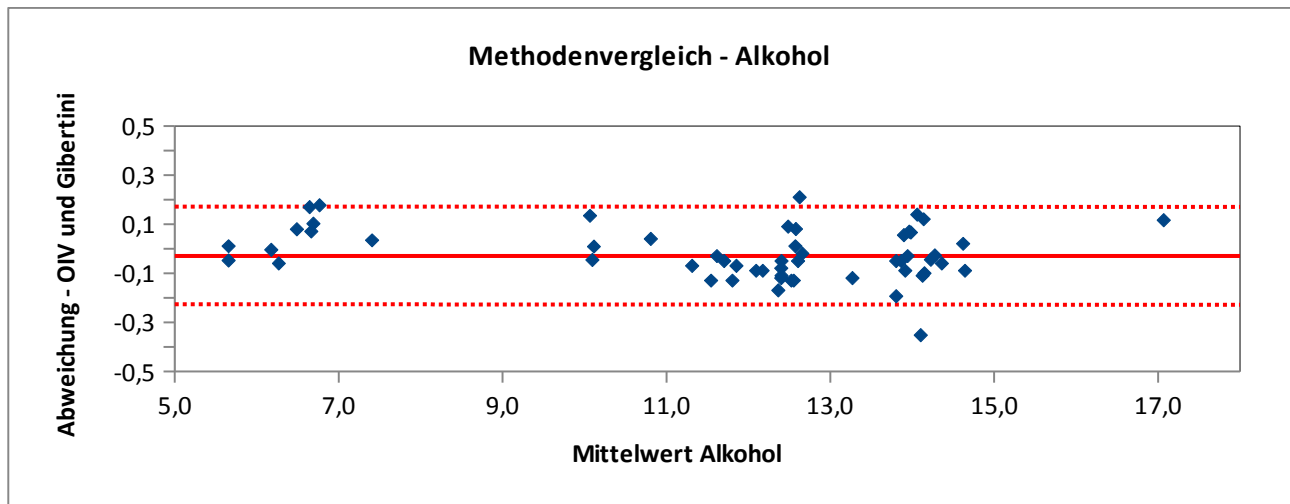


Abbildung 8: Bland-Altman-Diagramm zur Veranschaulichung der Messdifferenz zwischen der Methode mit Gibertini Apparatur und der Referenzmethode Alkohol (destillativ).

Beim Methodenvergleich der Alkoholbestimmung wurden insgesamt 59 Weine jeweils mit der akkreditierten OIV Referenzmethode, als auch mit der Gibertini Apparatur gemessen. Die Alkoholgehalte der gemessenen Weine liegen zwischen 5 Vol.-% und 18 Vol.-%.

Im Bland-Altman-Diagramm zeigt sich eine relativ geringe Abweichung der beiden Methoden. Erhöhte Werte der Referenzmethode gegenüber der Methode mittels Gibertini Apparatur werden im positiven Bereich angezeigt. Der Mittelwert der Differenzen liegt bei -0,03 Vol.-%. Somit können systematischen Messfehler innerhalb einer Methode ausgeschlossen werden. Die Schwankungsbreite der Abweichungen ist in einem gut vertretbaren Maß. Bei 6 Vol.-% und 14 Vol.-% können leicht erhöhte Werte festgestellt werden. Über den gesamten Messbereich betrachtet bleibt die Streuung jedoch schön verteilt. Die beiden gestrichelten Linien (MW \pm 1,96 \cdot SD) begrenzen den Bereich, in dem sich 95% aller Analysenergebnisse befinden („Limits of agreement“). In der Theorie von Bland Altman werden die „Limits of agreement“ mit vorher festgelegten a priori Kriterien verglichen. Als „strenges“ a priori Kriterium diene die Messunsicherheit der jeweiligen akkreditierten Methoden der Prüfstelle. Sie liegt bei Alkohol bei \pm 0,2 Vol.-%. Unter Einbeziehung der systematischen und zufälligen Fehler müssten nach diesen Voraussetzungen für eine „absolute Vergleichbarkeit“ der Methoden die Limits of agreement innerhalb dieser Toleranz liegen. Mit den „Limits of Agreement“ von 0,17 Vol.-% bis -0,23 Vol.-% kann das a priori Kriterium fast erreicht werden. Unter Berücksichtigung, dass die Messunsicherheit an sich nur für die akkreditierte Methode gilt (strenge Vorgabe für einen Methodenvergleich), sind die Methoden gut vergleichbar (vgl. PATZL- FISCHERLEITNER et al., 2016; GIAVARINI, 2015).

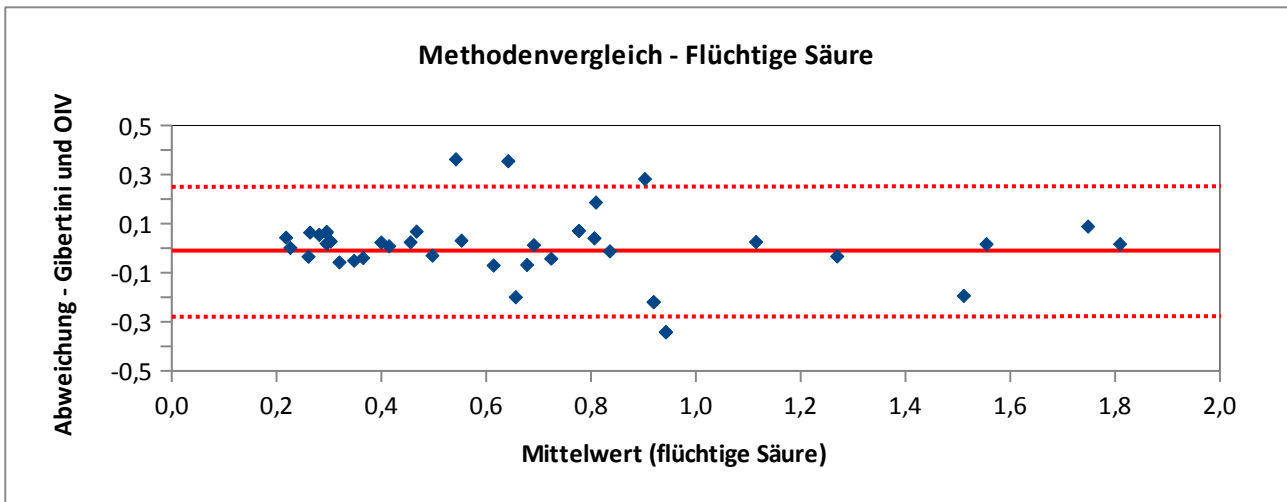


Abbildung 9: Bland-Altman-Diagramm zur Veranschaulichung der Messdifferenz zwischen der Methode mit Gibertini Apparatur und der Referenzmethode mit Woidich Apparatur.

Beim Methodenvergleich der flüchtigen Säure wurden insgesamt 44 Weine jeweils mit der akkreditierten OIV-Referenzmethode, als auch mit der Gibertini Apparatur destilliert. Die Titration wurde bei beiden Methoden gleich durchgeführt. Der Gehalt an flüchtiger Säure der gemessenen Weine lag zwischen 0,2 g/l und 1,8 g/l.

Das Bland-Altman-Diagramm zeigt eine schöne Streuung um den Nullpunkt. Im Diagramm werden die erhöhten Werte der OIV-Referenzmethode gegenüber der Vergleichsmethode von Gibertini im positiven Bereich angezeigt. Die berechneten Werte liegen gleichmäßig über den gesamten Messbereich verstreut und es liegen keine systematischen Fehler vor. Dies wird durch den geringen Mittelwert der Differenzen von -0,01 g/l bestätigt. Die Abweichungen zwischen der beiden Methoden sind zumeist sehr gering, nur 6 Wertepaare liegen über einer Differenz von 0,2. Bei der flüchtigen Säure liegt das a priori Kriterium bei $\pm 0,2$ g/l. Mit den „Limits of Agreement“ von 0,25 g/l bis -0,28 g/l kann auch hier das a priori Kriterium fast erreicht und die Methoden als gleichwertig betrachtet werden.

Überprüfung der Alkoholangabe am Etikett

Nach der Validierung wurde die Richtigkeit der Alkoholangabe am Etikett von 120 Weinen mit der Gibertini Apparatur überprüft. Dazu stand zusätzlich die hydrostatische Waage SUPER ALCOMAT von Gibertini zur Verfügung, mit welcher der vorhandene Alkohol (Vol.-%) bestimmt werden konnte.

Die Alkoholangaben am Etikett stimmten mit den 120 Messungen überein, deshalb wurden die erhobenen Werte mittels Gibertini zusätzlich mit den Referenzwerten des FTIR-Spektrometers verglichen. Die Ergebnisse wurden in einem Häufigkeitsdiagramm, abhängig von der Höhe der Abweichung, aufgetragen.

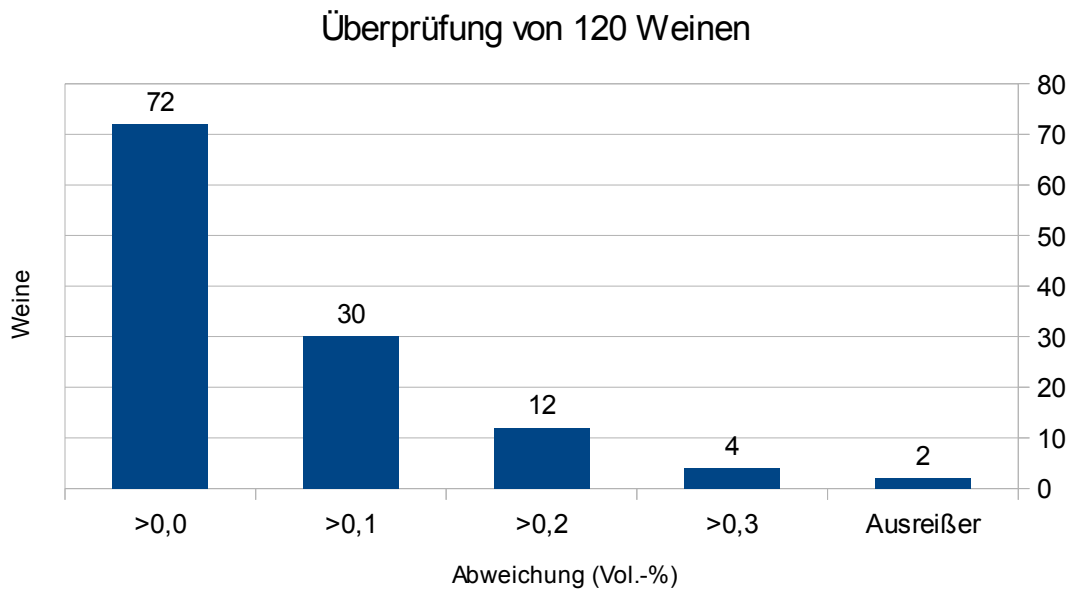


Abbildung 10: Häufigkeitsdiagramm der überprüften Weine in Abhängigkeit zur Abweichung des Messergebnisses zwischen der Gibertini Apparatur und des FTIR-Spektrometers

Diskussion

Im Zuge der Alkoholbestimmung mithilfe der Gibertini Apparatur wurden insgesamt gute Ergebnisse erzielt. Bei der Präzision der Alkoholbestimmung mittels der Destillationsapparatur sowie der hydrostatischen Waage von Gibertini lag die Standardabweichung der Wiederholbarkeit leicht über dem Referenzwert der OIV, während bei der Vergleichbarkeit ein guter Wert innerhalb des Vertrauensparameters der OIV erreicht werden konnte. Ein Faktor, der dieses Ergebnis eventuell beeinflusst haben könnte, war die hydrostatische Waage von Gibertini. Einzelne Luftbläschen in der Apparatur führten hier schon zu enormen Schwankungen in den Messwerten.

Bei der Grundkalibrierung der 6x6 Aufstockungsreihe konnte die Linearität bewiesen werden. Auch die errechnete Korrelation lag in einem hohen Bereich. Innerhalb der Reihe konnte der Arbeitsbereich bestätigt werden. Die Wahl der Kalibriersubstanz und der einzelnen Additionsgehalten fiel jedoch zu niedrig aus. Für eine Kalibriergerade über einen größeren Messbereich wäre eine Kalibriersubstanz nahe 0 Vol.-% und Additionen von 2-3 Vol.-% ideal gewesen.

Die Wiederfindungsraten der Alkoholkonzentration verliefen sehr zufriedenstellend. Im Durchschnitt konnte hier ein Wert von 98,5% erzielt werden.

Der Methodenvergleich zwischen der Gibertini Apparatur und der destillativen Alkoholbestimmung zeigte, dass die Gibertini Apparatur keine schlechteren Ergebnisse liefert. Außerdem konnten systematische Messfehler ausgeschlossen werden. Die Methoden konnten über den gesamten Messbereich als gleichwertig betrachtet werden. Auch der Vergleich der Gibertini Apparatur und des FTIR-Spektrometers zeigte bei einem Großteil der Ergebnisse eine Abweichung unter 0,1 Vol.-% und einen maximalen Wert von 0,35 Vol.-%.

Die Präzision der Bestimmung der flüchtigen Säure wurde sowohl bei der Gibertini Apparatur als auch mit der OIV-Referenzmethode gemessen. Beide Methoden konnten dabei gut Ergebnisse erzielen.

Die vier verwendeten Woidich Apparaturen bei der akkreditierten Methode unterschieden sich auch merklich in den erzielten Werten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der generelle Unterschied der Apparaturen beziehungsweise die Schwierigkeit eines gleichwertigen Aufbaus. Die Gibertini Apparatur ermöglicht hierbei eine deutlich bessere Standardisierung, da am Aufbau keine Veränderungen möglich sind und für die Vorbereitung der Destillation nur das Überführen der Probe notwendig ist.

Im Zuge der Grundkalibrierung durch die 6x6 Aufstockungsreihe konnte bei beiden Methoden die Linearität bewiesen werden. Die Korrelation und die relative Verfahrensstandardabweichung waren äußerst akzeptabel, die Gibertini Apparatur konnte jedoch in beiden Fällen bessere Ergebnisse erzielen. Der Arbeitsbereich konnte innerhalb der Messreihe nachgewiesen werden, der Messbereich hätte jedoch auch hier etwas größer gewählt werden können.

Mit 105% lag die durchschnittliche Wiederfindungsrate der Gibertini Apparatur um 10% unter der Referenzmethode (115%) und konnte somit einen sehr genauen Wert vorweisen. Die erhöhten Messwerte über 100% in allen Serien könnte möglicherweise an einer permanenten Übertitration liegen. Innerhalb der Serien konnte bei der Gibertini Apparatur eine minimale Standardabweichung erreicht werden, während mittels Woidich Apparatur zum Teil große Schwankungen verzeichnet wurden. Auch hier könnten wieder unterschiedliche Messgenauigkeiten zwischen den einzelnen Destillationsapparaturen aufgetreten sein.

Im Methodenvergleich mittels Bland-Altman-Diagramm wurden auch hier über den gesamten Messbereich keine systematischen Messfehler entdeckt. Bezogen auf die Kriterien der Prüfstelle, lieferte die Methode mit der Gibertini Apparatur gleichwertige Ergebnisse wie die Referenzmethode.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Gibertini Apparatur sowohl bei der Bestimmung des Alkohols, als auch bei der Bestimmung der flüchtigen Säure Werte innerhalb der festgelegten Grenzen durch die OIV lieferte. Bei der Validierung der Methoden zur Bestimmung der flüchtigen Säure konnten mit der Gibertini Apparatur sogar durchgehend bessere Werte als mit der Woidich Apparatur erreicht werden. Auch im Methodenvergleich nach Bland und Altman konnten keine signifikanten Abweichungen von den Referenzmethoden entdeckt werden. Die Leistungsfähigkeit erweist sich somit als bestätigt.

Literatur

- Nilok, P. 2010: Önologie – Die Wissenschaft der Kellerwirtschaft. FastBook Publishing Verlag
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. und Dubourdieu, D. 2006: Handbook of Enology - Volume 2 – The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley Verlag
- Margalit, Y., Crum, JD. und McClellan, A. 1997: Concepts in Wine Chemistry – The Wine Appreciation Guide. The Wine Appreciation Verlag
- Tanner, H. und Brunner, R. 1979: Getränke Analytik - Untersuchungsmethoden für die Labor und Betriebspraxis. Heller Chemie und Verwaltungsgesellschaft mbB Verlag
- Jakob, L. 1995: Lexikon der Önologie. Meininger Verlag
- Moreno-Arribas, M. und Polo, M. 2009: Wine Chemistry and Biochemistry. Springer Verlag
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. und Kunkee, R.E. 1996: Principles and Practices of Winemaking. Chapman und Hall Verlag
- Steidl, R., Schödl, H., Detz, C., Gössinger, M. und Leindl, G. 2001: Kellerwirtschaft. 7., aktualisierte und überarbeitete Auflage. Agrarverlag
- Jakob, L. 1996: Kellerwirtschaft. 6. Auflage. Fachverlag Fraund
- Linskens, H.F. und Jackson, J.F. 1988: Wine Analysis – Modern Methods of Plant Analysis. New Series Volume 6. Springer Verlag
- Scheiblhofer, H. 2011: Flüchtige Säuren minimieren. Der Winzer. Ausgabe 8. Agrarverlag: 20
- Eder, R., Barna, J., Berger, S., Gössinger, M., Steidl, R., Schödl, H. und Teuschler, S. 2007: Weinfehler – Erkennen, Vermeiden, Beheben. Agrarverlag
- Gertz, C. 1995: Methodvalidierung und Bewertung von Analyseergebnissen. In: Kromidas, S. (Hrsg.): Qualitätssicherung im analytischen Labor. Qualitätssicherungssysteme; Maßnahmen zur Qualitätssicherung; Der ganzheitliche Qualitätsgedanke. Weinheim: VCH, 181-206
- Kromidas, S. 2011: Handbuch Validierung in der Analytik. 2. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH
- Dertinger, G.; Gänshirt H. und Steinigen M. 1984: GAP. Praxisgerechtes Arbeiten in pharmazeutisch-analytischen Laboratorien. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
- Eder, R., Bergner, S., Schober, V., D`Ambrosio, L., Jung, R. 2004: Weinanalyse in eigenen Betrieb: Qualitätsparameter. Verlag Ulmer/Agrarverlag.
- Compendium of International Methods of Analysis – OIV Volatile acidity, OIV-MA-AS313-02: <http://www.oiv.int/public/medias/3732/oiv-ma-as313-02.pdf> (24.5.2017).

Patzl-Fischerleitner, E.; Pastler M. und Eder R. 2016: QM- Handbuch und Arbeitsanweisungen der akkreditierten Prüfstelle der HBLA und BA für Wein und Obstbau in Klosterneuburg, Methoden-Grenzwerte, Version 14.10.2016.

Giavarina, D. 2015: Understanding Bland Altman Analysis. *Biochemia Medica* 25.2: 141–151. <http://doi.org/10.11613/BM.2015.015> (06.6.2017)

Abbildungen

Abbildung 1:

Eder, R., Bergner, S., Schober, V., D`Ambrosio, L., Jung, R. 2004: Weinanalyse in eigenen Betrieb: Qualitätsparameter. Verlag Ulmer/Agrarverlag.